

# A cilindropermopszin cianobaktérium - alga interakcióban betöltött lehetséges szerepének vizsgálata

Dobronoki Dalma<sup>1</sup>, B-Béres Viktória<sup>2</sup>, Vasas Gábor<sup>3</sup>, Rektor Anett<sup>1</sup>, Nagy Sándor Alex<sup>1</sup>, Bácsi István<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Debreceni Egyetem TEK-TTK Hidrobiológiai Tanszék, 4032. Debrecen, Egyetem tér 1.

<sup>2</sup>Tiszántúli Környezetvédelmi, Természetvédelmi és Vízügyi felügyelőség, 4025. Debrecen, Hatvan u. 16.

<sup>3</sup>Debreceni Egyetem TEK-TTK Növénytan Tanszék, 4032. Debrecen, Egyetem tér 1.

**Kivonat:** A kiterjedt litorális régióval rendelkező vizekben jelentős a fitoplankton és fitobentosz taxonok kapcsolata. Előbbiek több módon is képesek befolyásolni a bentonikus közösségek egyedszámát és összetételét. Munkánk során a planktonikus cilindropermopszin-termelő *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) és egy bentikus *Chlorococcum* faj (Chlorophyta) közti interakciós kapcsolatokat vizsgáltuk kevert tenyészetekben, illetve tanulmányoztuk az *A. ovalisporum* teljes sejtkivonatának hatását a *Chlorococcum* faj növekedésére és tápanyag-felvételére. Kevert tenyészetekben mindkét faj sejtszáma alacsonyabb volt a kontroll tenyészetekénél, négyszeres *A. ovalisporum* sejtszám esetén a *Chlorococcum* növekedése 77%-os gátlást szenvedett, azonban a tápoldatban cilindropermopszint nem sikerült kimutatni. Az *Aphanizomenon* sejtkivonattal történő kezelés esetén is gátlás volt megfigyelhető már a kísérlet 7. napján is. A legnagyobb mennyiségben hozzáadott cianobaktérium kivonat a *Chlorococcum* tenyészetek növekedésében jelentős, de az együttnevelésnél megfigyeltől kisebb mértékű (50%-os) gátlást okozott. A kevert tenyészetekben a sejtszám függvényében jelentős változások mutatkoztak a tápanyagfelvételben, a kivonattal való kezelés eredményei alapján azonban úgy tűnik, hogy az *A. ovalisporum* kivonat nem befolyásolja a zöldalga normál tápanyag felvételi dinamikáját.

**Kulcsszavak:** *Aphanizomenon ovalisporum*, *Chlorococcum* sp., interakció.

## Bevezetés

A populációk természetes környezetükben nem egyedül, hanem más populációkkal együtt fordulnak elő. Az egyes taxonok populációi többek között táplálkozási szokásaikkal (tápanyag - interakció), exkretált vegyületeikkel (allelópátia), és számos más módon (pl.: fényért való versengés) jelentős mértékben befolyásolják más populációk életben-maradását, növekedését (Cloern, 1976, 1978; Sukenik et al., 2002; Hedger et al., 2004). Vízfolyásokban az allelopátia jelentősége a fitoplankton közösségekben minden bizonnyal lényegesen csekélyebb, de a bentikus közösségek életében itt is fontos szerepet játszhat. A sekély, kiterjedt litorális régióval rendelkező állóvizekben a fitobentosz és fitoplankton taxonok kapcsolata sokkal szorosabb, mint a mély, keskeny litorális régióval rendelkező vizekben. A planktonikus alga taxonok jelentős mértékben képesek befolyásolni a bentikus algaközösségek taxon-összetételét és egyedszámát (Leflaive et al., 2008).

A cilindropermopszin (CYN) fonális cianobaktériumok (pl. *Aphanizomenon ovalisporum*) által termelt szekunder metabolit, amely gátolja a proteinszintézist (Froschio et al., 2003), DNS károsodást okozhat (Humpage et al., 2000; Shen et al., 2002), hepatoxikus (Bernard et al., 2003; Saker et al., 2003; Fastner et al., 2003), illetve neurotoxikus (Pearson et al., 2010) hatásokkal bír. Ivóvízben megengedett mennyisége  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . A CYN a mikrocisztinek után a második legjobban kutatott cianotoxin, algaközösségekben betöltött szerepe azonban még nem tisztázott, ezért vizsgálata fontos és indokolt.

A *Chlorococcum* fajok a zöldalgák Chlorococcales rendjének igen széles körben elterjedt képviselői, megtalálhatók tengeri (Ohta et al., 1993), édesvízi (Kroes, 1971, 1972, Bhagavathy et al., 2011; Bhagavathy és Sumathi, 2012; Harwati et al., 2012), és szárazföldi élőhelyeken is (Zhang et al., 1997; Klockova et al., 2006).

Munkánk során a toxikus, CYN termelő *Aphanizomenon ovalisporum* és egy, a *Chlorococcum* nemzetségbe tartozó zöldalga faj közötti interakciós kapcsolatokat vizsgáltunk kevert, mindkét faj egyedeit tartalmazó tenyészetekben, továbbá tanulmányoztuk az *A. ovalisporum* teljes sejtkivonatának hatását a *Chlorococcum* faj növekedésére és tápanyag-felvételére.

## Anyag és módszer

*Az A. ovalisporum és a Chlorococcum sp. tenyészetek nevelési körülményei*

A kísérleteket a Debreceni Egyetem Hidrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében (Algal Culture Collection, Department of Hydrobiology, University of Debrecen) fenntartott *Chlorococcum* sp. (ACCDH-UD1002) és *Aphanizomenon ovalisporum* (ACCDH-UD1001) törzsekkel végeztük. A *Chlorococcum* törzs egy városi díszító litorális régiójából került izolálás-

ra. Az *A. ovalisporum* törzs az izraeli Kinneret-tóból izolált ILC-164 törzsből származik, cilindropermopszint (CYN) termel (Banker et al., 1997).

A tenyészeteket Jaworski-mediumban, 400 ml térfogatban, steril levegővel való buborékolattal, állandó fényen és hőmérsékleten ( $24^{\circ}\text{C}$ ) neveltük.

A *Chlorococcum* sp. inokulálási sejtszáma mind a kevert tenyészetekben, mind a kivonattal kezelt tenyészetekben, mind pedig a kontroll tenyészetekben  $0,2 \times 10^6$  sejt  $\text{mL}^{-1}$  volt.

Az *A. ovalisporum* sejtek száma a kevert tenyészetekben a kísérletek indításakor:  $0,2 \times 10^6$  sejt  $\text{mL}^{-1}$  (1:1 arányú tenyészet);  $0,4 \times 10^6$  sejt  $\text{mL}^{-1}$  (1:2 arányú tenyészet); és  $0,8 \times 10^6$  sejt  $\text{mL}^{-1}$  (1:4 arányú tenyészet) volt. A kevert tenyészetekkel végzett kísérletek során *A. ovalisporum* kontroll tenyészetekkel is dolgoztunk, melyekben a sejtszámot a kevert tenyészetek *A. ovalisporum* sejtszámának megfelelően állítottuk be.

A cianobaktérium kivonattal kezelt *Chlorococcum* tenyészetekhez a kevert tenyészetek *A. ovalisporum* inokulálási sejtszámának megfelelő mennyiségű teljes sejtkivonatot adtunk.

A tenyészetekből minden második napon vettünk mintát (i) a sejtszám meghatározására ( $400\times$  nagyítás, Olympus BX50 mikroszkóp); (ii) a felülúszó nitrát- illetve foszfát tartalmának meghatározására (MSZ 1484-13: 2009, MSZ 448-20: 1990), valamint (iii) a felülúszó CYN tartalmának meghatározására (Vasas et al., 2002).

## Statistikai elemzés

A kontroll és kezelt tenyészetek növekedési görbéi közötti különbségeket egyutas ANCOVA módszerrel elemeztük (Zar, 1996; Hammer et al., 2001).

## Eredmények

### A tenyészetek növekedése

A kevert tenyészetekben az inokulált sejtszámtól függetlenül – mindkét faj sejtszáma szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll tenyészetekénél. Különbség csak a növekedés-gátlás mértékében volt. Az 1:1 arányú kevert tenyészetekben a *Chlorococcum* sp. sejtszáma az inkubáció teljes ideje alatt magasabb volt a cianobaktériuménál (1a. ábra). Az 1:2 arányú kevert tenyészetekben a magasabb kiindulási sejtszáma ellenére csupán a tenyésztés első felében volt abundánsabb a cianobaktérium, viszont ekkor sem szignifikáns mértékben (1b. ábra). Az *A. ovalisporum* csak az 1:4 arányú kevert tenyészetekben tudta túlnőni a zöldalga populációját (1c. ábra), azonban a tenyésztési idő utolsó felében sejtszáma itt is drasztikusan csökkent, az inkubáció utolsó napján a cianobaktérium sejtszáma a *Chlorococcum* sejtek számánál már alacsonyabb volt (1c. ábra).

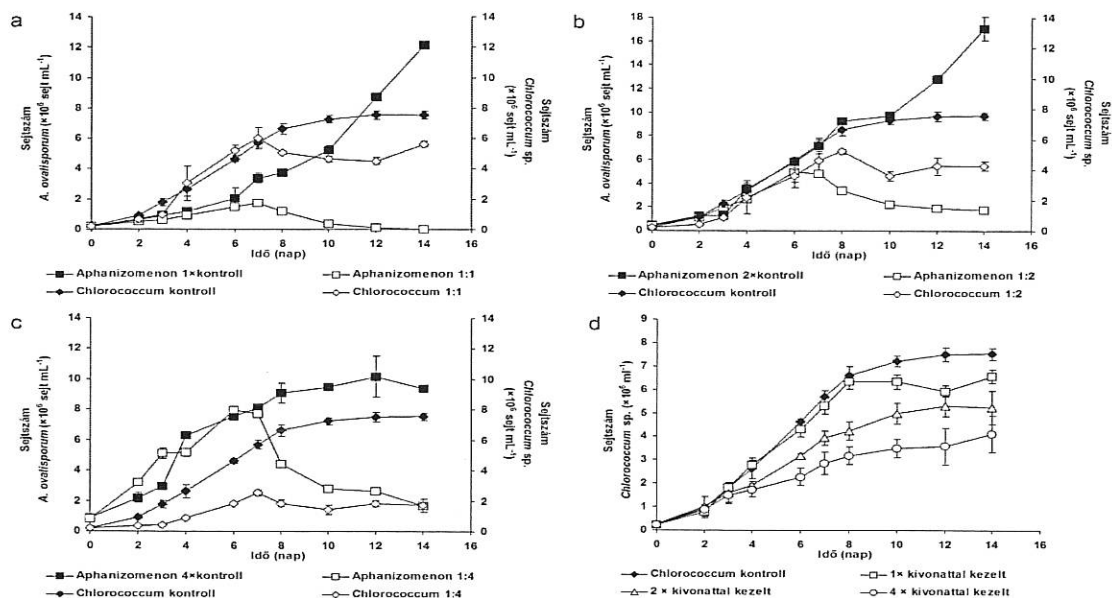
Meg kell jegyezni, hogy sem a kontroll cianobaktérium tenyészetekben, sem a kevert tenyészetekben nem sikerült extracelluláris CYN-t kimutatni.

Az *Aphanizomenon* kivonattal való kezelés a *Chlorococcum* tenyészet növekedésének gátlásához vezetett. A gátlás mértéke szoros összefüggést mutatott a kivonat koncentrációjával: minél nagyobb mennyiségben volt jelen a kivonat, annál erőteljesebb volt a gátlás (1d. ábra). Hangsúlyozni kell azonban, hogy együttnevelés során erőteljesebb gátlást tapasztaltunk a *Chlorococcum* kontroll tenyészetéhez képest, mint a kiindulási sejtszámnak megfelelő mennyiségű cianobaktérium sejtkivonattal való kezelés során.

*A tápanyagtartalom változása a tenyészetekben*

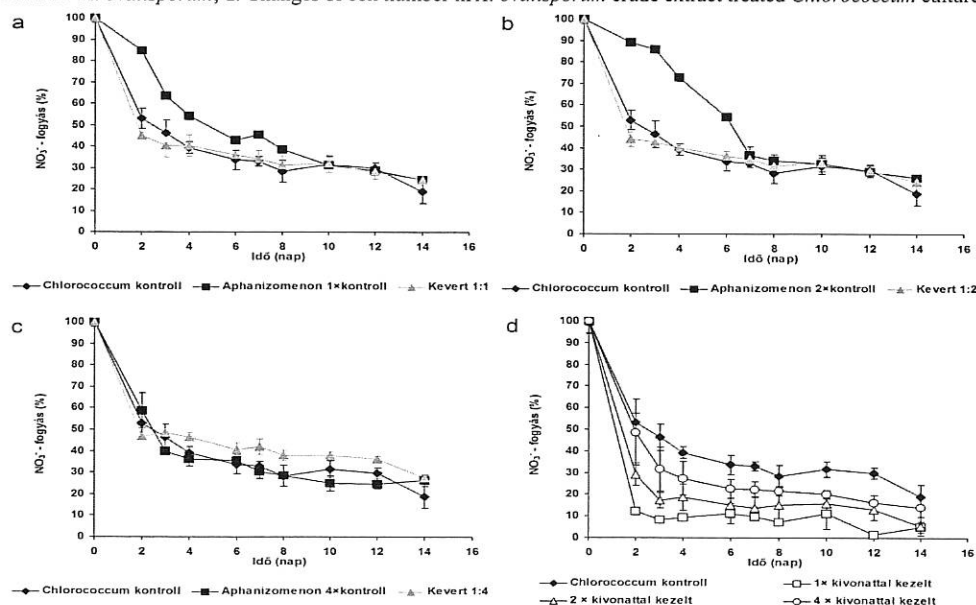
A kontroll tenyészetek és a kevert tenyészetek nitrát- és foszfát-tartalmában bekövetkező változások azt mutatták, hogy a kevert tenyészetekben a zöldalga az, ami a tápanyagtartalom-változásokat elsősorban befolyásolja - a kevert tenyészetekben a tápanyagtartalom-változások jobban hasonlítanak a *Chlorococcum* kontroll tenyészetekben megfigyelhető változásokhoz, mint az *Aphanizomenon* kontroll tenyészetekben megfigyelhetőkhöz (2a-c. és 3a-c. ábra).

A cianobaktérium kivonattal való kezelés során tapasztalt tápanyagtartalom-változások eredményei alapján elmondható, hogy az *A. ovalisporum* teljes sejtkivonata nem befolyásolta szignifikánsan a zöldalga normál tápanyag felvételi dinamikáját (2d és 3d. ábra)



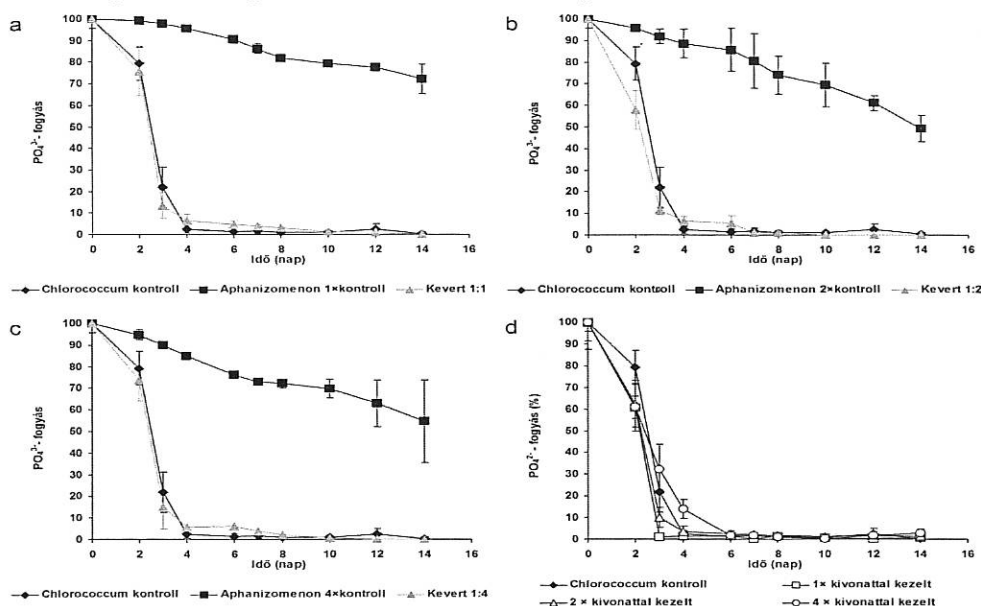
1. ábra a-c: A kevert és kontroll tenyészetek sejtszámban bekövetkező változások az idő függvényében. a)  $0,2 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *Chlorococcum* sp. és  $0,2 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *A. ovalisporum*; b)  $0,2 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *Chlorococcum* sp. és  $0,4 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *A. ovalisporum*; c)  $0,2 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *Chlorococcum* sp. és  $0,8 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *A. ovalisporum*; d) az *A. ovalisporum* kivonattal kezelt *Chlorococcum* tenyészetek sejtszámban bekövetkező változások az idő függvényében.

Figure 1 a-c: Changes of cell number in mixed and in control cultures. a)  $0,2 \times 10^6$  cell mL<sup>-1</sup> *Chlorococcum* sp. and  $0,2 \times 10^6$  cell mL<sup>-1</sup> *A. ovalisporum*; b)  $0,2 \times 10^6$  cell mL<sup>-1</sup> *Chlorococcum* sp. and  $0,4 \times 10^6$  cell mL<sup>-1</sup> *A. ovalisporum*; c)  $0,2 \times 10^6$  cell mL<sup>-1</sup> *Chlorococcum* sp. and  $0,8 \times 10^6$  cell mL<sup>-1</sup> *A. ovalisporum*; d) Changes of cell number in *A. ovalisporum* crude extract treated *Chlorococcum* cultures.



2. ábra a-c: A nitrát-fogyás dinamikája a kevert és kontroll tenyészetekben. a)  $0,2 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *Chlorococcum* sp. és  $0,2 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *A. ovalisporum*; b)  $0,2 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *Chlorococcum* sp. és  $0,4 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *A. ovalisporum*; c)  $0,2 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *Chlorococcum* sp. és  $0,8 \times 10^6$  sejt mL<sup>-1</sup> *A. ovalisporum*; d) az *A. ovalisporum* kivonattal kezelt *Chlorococcum* tenyészetek nitrát-tartalmában bekövetkező változások az idő függvényében.

Figure 2 Changes of nitrate-concentration in mixed and control cultures a)  $0.2 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *Chlorococcum* sp. and  $0.2 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *A. ovalisporum*; b)  $0.2 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *Chlorococcum* sp. and  $0.4 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *A. ovalisporum*; c)  $0.2 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *Chlorococcum* sp. and  $0.8 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *A. ovalisporum*; d: Changes of nitrate-concentration in *A. ovalisporum* crude extract treated *Chlorococcum* cultures.



3. ábra a-c: A foszfát-fogyás dinamikája a kevert és kontroll tenyészetekben. a)  $0.2 \times 10^6$  sejt  $\text{mL}^{-1}$  *Chlorococcum* sp. és  $0.2 \times 10^6$  sejt  $\text{mL}^{-1}$  *A. ovalisporum*; b)  $0.2 \times 10^6$  sejt  $\text{mL}^{-1}$  *Chlorococcum* sp. és  $0.4 \times 10^6$  sejt  $\text{mL}^{-1}$  *A. ovalisporum*; c)  $0.2 \times 10^6$  sejt  $\text{mL}^{-1}$  *Chlorococcum* sp. és  $0.8 \times 10^6$  sejt  $\text{mL}^{-1}$  *A. ovalisporum*; d: az *A. ovalisporum* kivonattal kezelt *Chlorococcum* tenyészetek foszfát-tartalmában bekövetkező változások az idő függvényében.

Figure 3 Changes of phosphate-concentration in mixed and control cultures a)  $0.2 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *Chlorococcum* sp. and  $0.2 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *A. ovalisporum*; b)  $0.2 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *Chlorococcum* sp. and  $0.4 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *A. ovalisporum*; c)  $0.2 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *Chlorococcum* sp. and  $0.8 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  *A. ovalisporum*; d: Changes of phosphate-concentration in *A. ovalisporum* crude extract treated *Chlorococcum* cultures.

### Diszkusszió

Különböző alga taxonok közti interakciós kapcsolatok vizsgálata nagy múltra tekint vissza (pl.: Cloern, 1976; Keating, 1978; Hedger et al., 2004; Suikannen et al., 2004; B-Béres et al., 2012). Elsődlegesen két nagy folyamatot kell számításba venni a vizsgálatok során: a két, vagy több faj jelenlétében általánosan megfigyelhető kompetíciót (pl.: tápanyag; fény), valamint a sokkal nehezebb kimutatható allelopátiát. Bár a legtöbb allelokemikáliát cianobaktériumokból írták le, annak bizonyítása, hogy a cianotoxinok allelokemikálik-e, még várat magára (Bácsi et al., 2013). Feltehetően toxinoként, de akár ugyanazon toxint termelő cianobaktérium törzsenként is más-más eredmény születhet (Volk et al., 2005; Gantar et al., 2007).

Az egyik legismertebb és leggyakrabban vizsgált cianotoxin a cilindrospermopszin (CYN). Ennek ellenére a CYN-termelést befolyásoló biotikus tényezőkről, ill. az alga-közösségben betöltött szerepéről nagyon kevés adat áll rendelkezésre (Bar-Yosef et al., 2010). Az, hogy az egyes toxintermelő cianobaktérium taxonok bocsátanak-e ki toxint, vagy sem, törzsenként, izolátumonként változhat. Míg egyes *A. ovalisporum* törzsek CYN-tartalma akár 90-100%-ban is extracelluláris lehet (Shaw et al., 1999), addig más törzseknél nem mutatható ki extracelluláris CYN (Bácsi et al., 2006; Rücker et al., 2008). A CYN alga-közösségben betöltött szerepéről még napjainkban is igen keveset tudni. Bar-Yosef és munkatársai (2010) kimutatták, hogy foszfát-hiány esetében nő az általuk vizsgált *A. ovalisporum*-mal együtt élő egyéb alga taxonok alkalikus foszfátáz aktivitása. Továbbá a foszfát-hiány fokozott CYN-termeléshez vezetett, de az nem derült ki, hogy extra-, vagy intracelluláris CYN-növekedést tapasztaltak. Így nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy esetükben allelopátiáról volt-e szó.

A cianobaktériális kivonatokkal végzett vizsgálatok nagy előnye, hogy lehetővé teszik a természetben lejátszódó folyamatok „élet-szerű” leképezését (B-Béres et al., 2012). Eredményeink azt mutatják, hogy az általunk vizsgált két taxon között elsődlegesen tápanyag-kompetícióról van szó, a cianotoxin sze-

repe másodlagos. Ezt támasztják alá mind a sejtszámban, mind pedig a tápanyag-tartalomban bekövetkező változások, valamint az a tény, hogy nem sikerült extracelluláris CYN-t kimutatni a tenyészetekből.

Az *A. ovalisporum* sejtkivonattal kezelt *Chlorococcum* sp. tenyészetekben tapasztalt növekedés-gátlás feltehetően a kivonattal CYN-tartalmának volt köszönhető. Tudomásunk szerint eddig egyetlen olyan tanulmány létezik, melyben CYN-tartalmú cianobaktérium-kivonatokkal végzett kísérletek eredményeit mutatták be (Pinheiro et al. 2013). Pinheiro és munkatársai (2013) azt tapasztalták, hogy a kisebb toxin-tartalmú ( $0,005-0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) nyerskivonatokkal kezelt zöldalga tenyészetek növekedése nem tért el szignifikánsan a kontroll tenyészetétől. Ezzel szemben a  $0,25-0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ -rel kezelt tenyészeteknél növekedés-serkentést, míg a  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ -rel kezelt tenyészeteknél növekedés-gátlást mutattak ki. Az általunk vizsgált *Chlorococcum* tenyészet lényegesen kevésbé érzékeny a CYN-ra.

### Köszönetnyilvánítás

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával (B-Béres Viktória), a Debreceni Egyetem Belső Kutatási Pályázat (Bácsi István), valamint a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (Bácsi István) támogatásával készült.

### Irodalom

- Bácsi I., Vasas G., Surányi G., M-Havas M., Máthé C., Tóth E., Grigorszky I., Gáspár A., Tóth S., Borbély G., 2006. Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate- or phosphate-starved cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. FEMS Microbiol. Lett. 259: 303-310.
- Bácsi I., B-Béres V., Vasas G., 2013. Possible Roles of Cyanotoxins in Species Interactions of Phytoplankton Assemblages. In: Ferrao-Filho, A.D.S. (ed.): Cyanobacteria: Ecology, Toxicology and Management. Nova Science Publishers, ISBN: 978-1-62417-966-2.
- Bhagavathy, S., Sumathi, P. and Jancy Sherene Bell, I. 2011. Green algae *Chlorococcum humicola* - a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, S1-S7.



- Bhagavathy, S. and Sumathi, P., 2012. Purification and characterization of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* by HPLC-NMR and LC-MS-APCI. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 2 (4): 276-282.
- Banker R., Carmeli S., Hadas O., Teltsch B., Porat R., Sukenik A., 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *J. Phycol.* 33: 613-616.
- Bar-Yosef Y., Sukenik A., Hadas O., Viner-Mozzini Y., Kaplan A., 2010. Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. *Curr. Biol.* 20: 1-5.
- B-Béres V., Grigorszky I., Vasas G., Borics G., Várbíró G., Nagy S.A., Borbely G., Bácsi I., 2012. The effects of *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) on *Cryptomonas ovata* (Cryptophyta) in laboratory cultures: why these organisms do not coexist in steady-state assemblages? *Hydrobiologia* 691: 97-107.
- Bernard C., Harvey M., Briand J.F., Bire R., Krysz S., Fontaine J.J., 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains, evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ. Toxicol.* 18: 176-186.
- Cloern, J.E., 1976. Recent limnological changes in southern Kootenay Lake, British Columbia. *Canadian Journal of Zoology* 54: 1571-1578.
- Cloern, J.E., 1978. Simulation model of *Cryptomonas ovata* population dynamics in southern Kootenay Lake, British Columbia. *Ecological Modelling* 4: 133-149.
- Fastner J., Heinze R., Humpage A.R., Mischke U., Eaglesham G.K., Chorus I., 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42: 313-321.
- Felföldy L., 1987. A biológiai vízminőség. 4. kiad. In: *Vízügyi Hidrobiológia* 16. - VGI, Budapest, 258.7
- Frosio S.M., Humpage A.R., Burcham P.C., Falconer I.R., 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ. Toxicol.* 18: 243-251.
- Gantar M., Berry J.P., Thomas S., Wang M., Perez R., Rein K.S., 2007. Allelopathic activity among Cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 55-64.
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4 (1): Unpaginated.
- Harwati T.U., Willke T., Vorlop K.D., 2012. Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp. *Bioresour. Technol.* 121:54-60.
- Hedger R.D., Olsen N.R.B., George D.B., Malthus T.J., Atkinson P.M., 2004. Modelling spatial distribution of *Ceratium hirundinella* and *Microcystis* spp. in a small productive British lake. *Hydrobiologia* 528: 217-227.
- Humpage A.R., Fenech M., Thomas P., Falconer I.R., 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat. Res.* 472: 155-161
- Keating, K.I., 1978. Blue-green algal inhibition of diatom growth: transition from mesotrophic to eutrophic community structure. *Science* 199: 971-973.
- Klochkova T.A., Kang S-H, Cho G.Y., Pueschel C.M., West J.A., Kim G.H., 2006. Biology of a terrestrial green alga, *Chlorococcum* sp. hlorococcales, Chlorophyta), collected from the Miruksazi stupa in Korea. *Phycologia* 45 (3): 349-358.
- Kroes H.W. 1971. Growth interactions between *Chlamydomonas globosa* Snow and *Chlorococcum ellipsoideum* Deason and Bold under different experimental conditions, with special attention to the role of pL-Limnol. *Oceanogr.* 16: 869-879.
- Kroes, H.W. 1972. Extracellular Products from *Chlorococcum ellipsoideum* and *Chlamydomonas globosa*. *Archiv Mikrobiologie*, 84: 270-274.
- Mohamed Z.A., 2007. First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59: 749-761.
- Ohta S., Chang T., Ikegami N., Kondo M., Miyata H. 1993. Antibiotic Substance Produced by a Newly Isolated Marine Microalga, *Chlorococcum* HS-101. *Bull Environ Contam Toxicol* 50: 171-178.
- Pearson L., Mihali T., Moffitt M., Kellmann R., Neilan B., 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar. Drugs* 8 (5): 1650-1680.
- Pinheiro C., Azevedo J., Campos A., Loureiro S., Vasconcelos V., 2013. Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. *Hydrobiologia*, 705 (1): 27-42.
- Rücker J., Stuken A., Nixdorf B., Fastner J., Chorus I., Wiedner C., 2008. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 Aphanizomenon-dominated temperate lakes. *Toxicon* 50: 800-809.
- Saker M.L., Nogueira I.C.G., Vasconcelos V.M., Neilan B.A., Eaglesham G.H., Pereira P., 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55: 243-250.
- Shaw G.R., Sukenik A., Livne A., Chiswell R.K., Smith M.J., Seawright A.A., Norris R.L., Eaglesham G.K., Moore, M.R. (1999). Blooms of the hepatotoxic cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environ. Toxicol.* 14: 167-177.
- Shen, X., Lam, P.K.S., Shaw, G.R., Wickramasinghe, W., 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 40, 1499-1501.
- Suikkanen S., Fistarol G.O., Granéli E., 2004. Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 308: 85-101.
- Sukenik A., Eshkol R., Livne A., Hadas O., Rom M., Tchernov, D., Vardi A., Kaplan A., 2002. Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): a novel allelopathic mechanism. *Limnol. Oceanogr.* 47 (6): 1656-1663.
- Vasas G., Gáspár A., Surányi G., Batta Gy., Gyémánt Gy., Hamvas M., Máthé C., Grigorszky I., Molnár E., Borbely Gy., 2002. Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (Blue-Green Sinapis Test) *Anal. Biochem.* 302: 95 - 103.
- Volk R.B., 2005. Screening of microalgal culture media for the presence of algal compounds and isolation and identification of two bioactive metabolites, excreted by the Cyanobacteria *Nostoc insulare* and *Nodularia harveyana*. *J. Appl. Phycol.* 17: 339-347.
- Zar J. H., 1996. *Biostatistical Analysis*, 3rd ed. Prentice-Hall International, NJ, USA.
- Zhang D.H., Lee Y.K., Ng M.L. and Phang S.M. 1997. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. *Journal of Applied Phycology*, 9 (2): 147-155.

### Investigation of the possible role of cylindrospermopsin in cyanobacterium – eukaryotic alga interaction

Dobronoki, D., B-Béres, V., Vasas, G., Rektor, A., Nagy, S.A., Bácsi, I.

**Abstract:** Relations between phytoplankton and phytobentos taxa could be significant in lakes and ponds with extended littoral region. Phytoplankton could affect the individual number and species composition of benthic assemblages in many ways. In this work the interactions between the planktic, cylindrospermopsin producer *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) and a benthic *Chlorococcum* species (Chlorophyta) were investigated in mixed cultures. The effect of *A. ovalisporum* crude extract on *Chlorococcum* cultures were also studied. Cell numbers of both species were lower in mixed cultures compared to control cultures. Cell number of *Chlorococcum* decreased by 77 % in the presence of 4-fold amount of *Aphanizomenon*, nevertheless extracellular cylindrospermopsin was not detectable. Crude extract of *A. ovalisporum* caused growth inhibition of *Chlorococcum* already to the 7<sup>th</sup> day of the experiment, but in lower extent (max. 50 %), than in mixed cultures. Nutrient levels changed in a cell number dependent manner in mixed cultures, while it seems that the cyanobacterial extract has no significant effect to the nutrient uptake of the eukaryotic green alga.

**Keywords:** *Aphanizomenon ovalisporum*, *Chlorococcum* sp., interaction.